

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 25 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592523

研究課題名(和文) エピジェネティクスを標的とした癌幹細胞への新しい治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic strategies targeting epigenetics in cancer stem cells

研究代表者

近松 一郎 (Chikamatsu, Kazuaki)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30301378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞は治療抵抗性と言われ、既存の抗がん剤や放射線治療が効きにくいと言われている。今回エピジェネティクスを標的とした分子標的薬剤であるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(Histone Deacetylase Inhibitor; HDACi)が癌幹細胞形質へどのように作用するか検討した。HDACiは頭頸部扁平上皮癌細胞に対して細胞傷害性やアポトーシス誘導を示すのみならず、癌幹細胞マーカーの発現抑制、幹細胞関連遺伝子の発現抑制、EMTの抑制といった作用を示した。また、抗がん剤との併用によって相乗効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：Evidence has accumulated indicating that cancer stem cells (CSCs) are responsible for the treatment resistance. Therefore, the development of novel therapeutic strategies to overcome treatment resistance of CSCs is needed. To explore the possibility of targeting epigenetics changes for treatment against CSCs, the effects of two histone deacetylase inhibitors (HDACi), suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) and trichostatin A (TSA), on CD44+ cancer stem-like cell lines were investigated. The expression of CSC markers was decreased by HDACi treatment. In addition, HDACi decreased mRNA expression levels of stemness-related genes and suppressed the epithelial-mesenchymal transition phenotype of CSCs. The combination of HDACi and chemotherapeutic agents had a synergistic effects on tumor cell lines.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 耳鼻咽喉科学

キーワード：癌

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞仮説が数十年以上前に提唱されて以来、近年の幹細胞生物学や細胞工学の発達により癌の臨床検体あるいは細胞株から癌幹細胞(Cancer stem cell:CSC)が同定され、その機能解析が進んできた。これまでに頭頸部癌扁平上皮癌についても CD44, CD133, ALDH-1などをマーカーとして CSC の同定や細胞学的機能解析が行われ、他癌腫と同様に CSC の悪性度が非常に高いことが示されている。

この悪性度が高く、治療抵抗性に関与している CSC を標的とした治療戦略となる候補分子として 自己複製因子、薬剤耐性機構、エピジェネティクス制御異常、分化促進などに関わる分子が挙げられる。

エピジェネティックな遺伝子発現制御とは、DNA 塩基配列の変化を伴わず DNA への後天的な作用により遺伝子発現が制御されることに起因する形質変異であり、エピジェネティックな転写制御機構が癌関連遺伝子の発現制御に関与していることが認識され、その分子機構が解明されてきている。アセチル化されたヒストンは、凝集したクロマチン構造をほぐし、種々の分子が DNA に接近できるようになるため、転写を活性化する。アセチル化は、ヒストンアセチル化酵素(HAT)によるアセチル化と、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)による脱アセチル化のバランスにより制御されている。しかしながら癌細胞の多くではこのバランスが崩れていることにより増殖促進・分化阻害・アポトーシス抑制・細胞接着異常・血管新生・転移といった機能を獲得する。一方、エピジェネティクスは幹細胞分化を制御する重要なシステムでもあり、幹細胞の自己複製制御や分化・生死に関わるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の破綻が癌幹細胞への形質変異に大きく関与していると思われる。このような背景を基に、CSC に対する治療戦略として、エピジェネティクスに着目した。

2. 研究の目的

癌におけるエピジェネティクス制御異常の解除を目指した治療の一つとしてヒストンアセチル化酵素阻害剤(HDAC inhibitor: HDACi)が存在する。ヒトには 18 の HDAC が同定されており、転写調節に係る多くのタンパク質と複合体を形成している。これを阻害することにより多くの遺伝子発現が変化する。これまでに報告されている HDACi は短鎖脂肪酸、ヒドロキサム酸、エポキシケトン、環状ペプチド、ペンスアミドの 5 つのグループに大きく分類される。この HDACi は従来の抗がん剤とは全く異なる作用機序を有しており、癌細胞内で引き起こされた転写の異常抑制状態を正常な転写機能を再構築させることが期待できる。その抗腫瘍メカニズムとしては、細胞周期停止、アポトーシス経路の活性化、抗血管新生、分化誘導などがわかっている。今回の研究ではこの HDACi が CSC に対して抗腫瘍効果を示すのか、そしてどのようなメカニズムが作用するのかについて検討する。

3. 研究の方法

これまでに頭頸部扁平上皮癌の癌幹細胞の機能解析での研究において、頭頸部癌扁平上皮癌株を無血清培地下に EGF+FGF のサイトカインを加え培養することにより癌幹細胞のマーカーの一つである CD44+細胞の比率が高くなることがわかっている。この培養系を用いて研究を進めた。

HDACi としては、suberoylanilide hydroxamic acid: SAHA と trichostatin A: TSA の 2 種類を使用した。この 2 つの薬剤を選択した理由はその作用機序の解析が比較的すすんでいることに加え、SAHA に関しては実際に FDA が癌の治療薬として承認しており、将来の臨床試験へ移行できる可能性が高いと思われるからである。HSC-2 と KUMA-1 という 2 つの頭頸部扁平上皮癌の細胞株は、EGF+FGF 添加無

血清培地にて培養することにより CD44+細胞の比率が増加することを確認した。この細胞株に対して SAHA と TSA を作用させて以下の項目について検討した。

(1)細胞増殖能;MTS assay, Flow Cytometry

(2) 細胞周期の変化: Flow Cytometry

(3) Sphere formation assay

(4) がん幹細胞マーカーの変化: Flow Cytometry, Immunoblotting, real time qRT-PCR

(5) 幹細胞関連遺伝子発現: real time qRT-PCR

(6) EMT 関連分子の変化: Immunoblotting

(7) 抗がん剤との併用効果: Isobologram analysis

4 . 研究成果

(1) 細胞増殖能

HSC-2 と KUMA-1 は両者とも HDACi によって細胞増殖能が用量依存性に抑制された。

SAHA の IC50 は HSC-2, 12.1 μ M, KUMA-1, 7.1 μ M であった。TSA の IC50 は HSC-2, 1.9 μ M, KUMA-1, 1.4 μ M であった。

また、HDACi を作用させることにより、アポトーシスを起こす細胞の比率が上昇した。

(2) 細胞周期の変化

HDACi によって HSC-2, KUMA-1 とともに G2/M 期の比率が増加した。また KUMA-1 においては、G0/G1 期の細胞の比率も増加した。

以上より、これまでの報告と同様に HDACi は癌細胞株に作用して細胞増殖の抑制、アポトーシスの誘導、そして細胞周期の停止の作用を示すことが確認された。

(3) Sphere formation assay

HDACi を作用させることにより、両細胞株とも有意に sphere formation の数が低下した。

(4) 癌幹細胞マーカーの変化

HDACi の作用による CSC のマーカーである CD44, ABCG2 の発現変化を Flow Cytometry にて検討したところ、これらのマーカーの発

現低下が認められた。また Immunoblotting 及び real time qRT-PCR によっても発現の低下が確認できた。

(5) 幹細胞関連遺伝子発現

BMI1, Notch, Nanog, Oct-4 といった幹細胞関連遺伝子の発現変化をみたところ、HDACi によっていずれの遺伝子発現も低下を示した。

(6) 上皮間葉移行関連分子の変化

上皮間葉移行関連分子である E-cadherin は HDACi を作用させることによりその発現が增强した。また上皮間葉移行を誘導する TGF- β の遺伝子発現は低下したことより、上皮間葉移行が抑制される結果であった。

(7) 抗がん剤との併用効果

頭頸部扁平上皮癌に対して臨床で使用される 2 種類の抗癌剤、CDDP と Docetaxel との併用効果について検討したところ、HDACi とこれら抗がん剤は相乗効果を示す結果であった。

5 . 主な発表論文等 (計 1 2 件)

Toyoda M, Kaira K, Ohshima Y, Ishioka NS, Shino M, Sakakura K, Takayasu Y, Takahashi K, Tominaga H, Oriuchi N, Nagamori S, Kanai Y, Oyama T, Chikamatsu K. Prognostic significance of amino-acid transporter expression (LAT1, ASCT2, and xCT) in surgically resected tongue cancer. Br J Cancer 2014;(in press). 査読有

Kayakabe M, Takahashi K, Okamiya T, Segawa A, Oyama T, Chikamatsu K. Combined small cell carcinoma of the sinonasal tract associated with syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone. Oncol. Lett. 2014;7:1253-1256. 査読有

Chikamatsu K, Ishii H, Murata T, Sakakura K, Shino M, Toyoda M, Takahashi K, Masuyama K. Alteration of cancer stem cell-like phenotype by histone deacetylase

inhibitors in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Sci.* 2013;104:1468-1475. 査読有

Igarashi S, Chikamatsu K, Miyata M, Maenosono M, Yonaga T, Nakazawa T, Katoh R, Masuyama K. Epithelial-myoepithelial carcinoma of the parotid gland: a case report and immunohistochemical analysis. *Yamanashi Med. J.* 2013;27:71-78. 査読有

Murata T, Shino M, Yasuoka Y, Chikamatsu K. Subglottic schwannoma: a report of a rare case that was treated with medial thyrotomy. *Am. J. Otolaryngol.* 2013;34:569-573. 査読有

Kaira K, Toyoda M, Shino M, Sakakura K, Takahashi K, Tominaga H, Oriuchi N, Kanai Y, Oyama T, Chikamatsu K. Clinicopathological significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in patients with adenoid cystic carcinoma. *Pathol. Oncol. Res.* 2013;19:649-656. 査読有

Shimada T, Kamada H, Hoshino R, Okamiya T, Takahashi K, Chikamatsu K. Development of a new method using narrow band imaging for taste assessment. *Laryngoscope* 2013;123:2405-2410. 査読有

Shino M, Yasuoka Y, Murata T, Ninomiya H, Takayasu T, Takahashi K, Chikamatsu K. Improvement of tracheal flap method for laryngotracheal separation. *Laryngoscope* 2013;123:440-445. 査読有

Chikamatsu K, Sakakura K, Toyoda M, Takahashi K, Yamamoto T, Masuyama K. Immunosuppressive activity of CD14+HLA-DR- cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Sci.* 103:976-983, 2012. 査読有

Chikamatsu K, Ishii H, Takahashi, G, Okamoto A, Moriyama M, Sakakura K,

Masuyama K. Resistance to apoptosis-inducing stimuli in CD44+ head and neck squamous cell carcinoma cells. *Head Neck* 34:336-343, 2012. 査読有

Yamanishi T, Chikamatsu K, Takahashi G, Endo S, Masuyama K. Immune regulation by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with Japanese cedar pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 156:187-195, 2011. 査読有

Chikamatsu K, Takahashi G, Sakakura K, Ferrone S, Masuyama K. Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck.* 33:208-215, 2011. 査読有

〔雑誌論文〕(計7件)

Sakakura K, Chikamatsu K. Immune suppression and evasion in patients with head and neck cancer. *Adv Cell Mol Otolaryngol* 2013;1: Review 査読有

星野竜, 島田哲明, 鎌田英男, 近松一朗. 骨髄移植後に発症した口腔内異時性多重癌の1症例. *口咽科* 27:63-68, 2014. 査読有

近松一朗. 頭頸部癌に対する重粒子線治療. *耳鼻臨床* 106:184-185, 2013. 査読無

近松一朗. 頭頸部癌における Myeloid-derived suppressor cell の果たす役割. *耳鼻免疫アレルギー* 30:271-278, 2012. 査読無

近松一朗. Current Article 頭頸部扁平上皮癌における癌幹細胞とその治療戦略. *耳鼻喉頭頸* 84:335-344, 2012. 査読無

豊田 実, 近松一朗. 特殊疾患診療 NAVI, 3.Wegener 肉芽腫症. *耳鼻喉頭頸* 84:339-343, 2012. 査読無

近松一朗, 増山敬祐. がん免疫療法に関する最近の話題. *耳鼻臨床* 105:87-94, 2012. 査読無

〔学会発表〕(計 14 件)

豊田実、坂倉浩一、解良恭一、横堀有紀、近松一朗 頭頸部腺様嚢胞癌の新しい予後マーカーの検討 第 37 回日本頭頸部癌学会 2013 年 6 月 13-14 日(東京都)

横堀有紀、豊田実、坂倉浩一、解良恭一、近松一朗 口腔扁平上皮癌における FDG-PET max SUV 値の imaging biomarker としての可能性について 第 37 回日本頭頸部癌学会 2013 年 6 月 13-14 日(東京都)

高安幸弘、紫野正人、豊田実、高橋克昌、近松一朗、斉藤淳一、白井克幸、大野達也、中野隆史 群馬大学における頭頸部非扁平上皮癌に対する重粒子線治療成績 第 114 回日本耳鼻咽喉科学会 2013 年 5 月 15-18 日(札幌市)

豊田実、坂倉浩一、解良恭一、横堀有紀、近松一朗 頭頸部腺様嚢胞癌の新しい予後のマーカーの検討 第 114 回日本耳鼻咽喉科学会 2013 年 5 月 15-18 日(札幌市)

Minoru Toyoda, Koichi Sakakura, Yuki Yokobori, Kazuaki Chikamatsu Biological markers as predictors of clinical outcome in adenoid cystic carcinoma of the head and neck Combined Otolaryngological Spring Meeting, Orlando USA, April 10-14, 2013

Koichi Sakakura, Takaaki Murata, Kazuaki Chikamatsu Alteration of cancer stem cell-like phenotype by histone deacetylase inhibitors in squamous cell carcinoma of the head and neck Combined Otolaryngological Spring Meeting, Orlando USA, April 10-14, 2013

Koichi Sakakura, Takaaki Murata, Minoru Toyoda, Yuki Yokobori, Kazuaki Chikamatsu Therapeutic potentials of histone deacetylase inhibitors for cancer stem cell-like cell phenotype in squamous cell carcinoma of the head and neck AACR Annual Meeting Washington DC, April 6-10,

2013

坂倉浩一、近松一朗 癌抗原 CSPG4 を標的とした頭頸部癌に対する免疫療法の可能性 第 31 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2013 年 2 月 7-9 日(倉敷市)

星野竜、島田哲明、鎌田英男、近松一朗 骨髄移植後慢性 GVHD 患者に発症した口腔内異時性多重癌の 1 症例 第 25 回日本口腔・咽頭科学会 2012 年 9 月 13-14 日(熊本市)

Koichi Sakakura, Minoru Toyoda, Katsumasa Takahashi, Takanori Yamamoto, Motohiro Moriyama, Keisuke Masuyama, Kazuaki Chikamatsu Immunosuppressive Impact on Head and Neck Cancer Patients by CD14+HLA-DR-Myeloid-Derived Suppressor Cells 8th International Conference on Head and neck Cancer July 21-25, 2012 Toronto, Canada

村田考啓、長井今日子、中島恭子、安岡義人、近松一朗 陽子線治療を施行した小児耳下腺粘表皮癌の 1 症例 第 7 回日本小児耳鼻咽喉科学会 2012 年 6 月 21-22 日(岡山市)

坂倉浩一、豊田実、増山敬祐、近松一朗 頭頸部癌における CD14+HLA-DR-単球系ミエロイド由来サブレッサー細胞による免疫抑制効果 第 36 回日本頭頸部癌学会 2012 年 6 月 7-8 日(松江市)

加家壁美樹子、紫野正人、坂倉浩一、豊田実、近松一朗 上顎洞原発 Combined small cell carcinoma の 1 例 第 36 回日本頭頸部癌学会 2012 年 6 月 7-8 日(松江市)

近松一朗、坂倉浩一 頭頸部扁平上皮癌患者における単球系 myeloid-derived suppressor cells の免疫抑制に果たす役割 (Immunosuppressive role of monocytic myeloid-derived suppressor cells in patients with head and neck cancer) 第 70 回日本癌学会 2011 年 10 月 3-5 日(名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

近松 一郎（CHIKAMATSU Kazuaki）

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30301378